WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

WO 99/39209 (51) Internationale Patentklassifikation 6: (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: A1 G01N 33/574 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)

DE

PCT/EP99/00639 (21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 1999 (01.02.99)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-GENES GMBH [DE/DE]; Köpenicker Strasse 23, D-12555 Berlin (DE).

2. Februar 1998 (02.02.98)

(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOLTZHAUER, Martin [DE/DE]; Wandlitzstrasse 13, D-10318 Berlin (DE). OVODOV, Sergej [DE/DE]; Suhler Strasse 70, D-12629 Berlin (DE). KNOLL, Alexander [DE/DE]; Nossener Strasse 59, D-12627 Berlin (DE).

(74) Anwälte: ZIEBIG, Marlene, K. usw.; Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist: Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: IMMUNOASSAY AND TEST KIT FOR ASSAYING FUCOSYLISED PROTEIN IN A BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Bezeichnung: IMMUNOASSAY UND TESTKIT ZUR BESTIMMUNG VON FUCOSYLIERTEM PROTEIN IN EINER BIOLO-GISCHEN PROBE

(57) Abstract

(30) Prioritätsdaten:

198 06 185.4

The invention relates to a sandwich immunoassay for determining the quantity of fucosylised protein (fuc-protein) in a biological sample and to corresponding reagent sets. A preferred version of the invention relates to an immunoassay for assaying fucosylised α -foetoprotein (AFP) which is significant in the early detection of hepatocellular carcinoma (HCC), a common form of cancer. Said immunoassay is characterized in that it uses a lectin selected from the group consisting of Ulex-europaeus agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolobus agglutinin (LTA) and Anguilla-anguilla agglutinin (AAA).

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Sandwich-Immunoassay zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein (Fuc-Protein) in einer biologischen Probe und dazugehörige Reagentiensätze. In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Immunoassay zur Bestimmung von fucosyliertem α-Fetoprotein (AFP), das bei der Früherkennung des hepatocellulären Carcinoms (HCC) als einer häufigen Krebsform von Bedeutung ist. Der Immunoassay ist dadurch gekennzeichnet, daß ein Lectin ausgewählt aus der Gruppe Ulex-europaeus-Agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolobus-Agglutinin (LTA) und Anguilla-anguilla-Agglutinin (AAA) eingesetzt wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Amenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AM	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AT	•	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MC ·	Мопасо	TD	Tschad .
AZ	Aserbaidschan	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BB	Barbados	GN	Guinca	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BF	Burkina Faso			ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	HU IE	Ungam Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BJ	Benin			MR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilien	IL	Israel			US	Vereinigte Staaten von
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
C1	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
СМ	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE.	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		
LE	F-36 101144				- .		

Immunoassay und Testkit zur Bestimmung von fucosyliertem Protein in einer biologischen Probe

5

10

15

20

25

30

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Sandwich-Immunoassay zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein (Fuc-Protein) in einer biologischen Probe und dazugehörige Reagentiensätze. In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Immunoassay zur Bestimmung von fucosyliertem α -Fetoprotein (AFP), das bei der Früherkennung des hepatocellulären Carcinoms (HCC) als einer häufigen Krebsform von Bedeutung ist.

von pathologisch erhöhte Fucosylierung Die Tumordiagnostik eine Glycoproteinen spielt in der wichtige Rolle, da zunehmend diese Glycosylierungs-Oligosaccharid-Seitenkette der Glycoproteinen als tumorassoziiert erkannt werden. So wird z.B. in Aoyagi, Q. et al. (1985) Biochim. Biophys. Acta <u>830</u>, 217-223 und Aoyagi, Y. et al. (1988) Cancer 61, 769-774 oder Wu, J.T. (1990) Ann. Clin. Lab.Sci. 20, 98-105 die Fucosylierung des pathologischen AFP als hepatocelluläres Carcinom für ein spezifisch beschrieben.

Die Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein kann daneben auch bei der Beurteilung von rekombinant 5

10

15

20

25

hergestellten Glycoproteinen, die als Therapeutika Verwendung finden sollen, eine Rolle spielen, insbesondere bei der Prozeßkontrolle.

Es ist bekannt, pathologisch fucosylierte Proteine mittels Affinitäts- und Immunoaffinitäts-Elektrophorese, meist nach Blotting auf antikörperbeschichtete Membranen, nachzuweisen (Taketa K., J.Chromatogr. <u>569</u>, 229-241, 1991). Auch Affinitätschromatographie-Verfahren werden verwendet. Zur Anwendung in der klinischen Praxis sind diese Methoden allerdings ungeeignet.

Zur Unterscheidung von fucosyliertem und nicht-fucosyliertem AFP werden in der Literatur auch Lectin-Enzymimmunoassays mit den Lectinen Concanavalin A (ConA), Lens-culinaris-Lectin A (LCA) und Phaseolus-vulgaris-Haemagglutinin E (PHA-E) beschrieben (Yasufumi Suzuki et al., Ann. Clin. Biochem. 1990, 27, 121-128; Noriaki Kinoshita et al. (1989), Clinica Chimica Acta 179, 143sich allerdings herausgestellt, 152). Es hat Lectin-Enzymimmunoassays mit den genannten Lectinen die Anforderungen bezüglich Spezifität und Empfindlichkeit, die an einen klinischen Test zur quantitativen Bestimmung von fucosylierten Proteinen gestellt werden müssen, nicht erfüllen. Für den Fall der Lectine ConA und eine schlechte auch zusätzlich LCA wurde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse festgestellt.

5

10

15

20

25

30

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, eine Nachweismethode für fucosylierte Proteine bereitzustellen, die ausreichend sensitiv, spezifisch und reproduzierbar ist und in der klinischen Praxis ohne Probleme angewendet werden kann. Die Nachweismethode soll leicht handhabbar und auch für Routineuntersuchungen im klinischen Bereich geeignet sein. Es war insbesondere die Aufgabe der Erfindung, eine Nachweismethode für fucosyliertes α -Fetoprotein, einem Tumormarker in der Leberdiagnostik, bereitzustellen.

Die Aufgabe der Erfindung wird wie in den Ansprüchen angegeben gelöst. Der erfindungsgemäße Immunoassay zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein in einer biologischen Probe ist dadurch gekennzeichnet, daß a) immobilisierter Anti-Fuc-Protein-Antikörper oder ein immobilisiertes Anti-Fuc-Protein-Antikörperfragment mit der biologischen Probe unter Ausbildung eines Fucb) ein Protein-Antiköperkomplexes inkubiert wird, Ulex-europaeusausgewählt aus der Gruppe Lectin Agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolobus-Agglutinin (LTA) und Anguilla-anguilla-Agglutinin (AAA) zugesetzt wird, das geeignete Markierungen aufweist, um die Menge des Fuc-Protein-Antiköperkomplexes und daraus die Menge an fucosyliertem Protein in an sich bekannter Weise zu bestimmen oder b) ein unmarkiertes Lectin ausgewählt genannten Gruppe zugesetzt wird und der Fuc-Protein-Antikörperkomplexes mittels Nachweis des markierter Anti-Lectin-Antikörper gegen die genannten Lectine in an sich bekannter Weise erfolgt. Es hat sich gezeigt, daß mit dem erfindungsgemäßen Assay und durch

den Einsatz der ausgewählten Lectine UEA, LTA und AAA Empfindlichkeit Spezifität und bessere weit eine Literatur mit der den in erreicht als wird beschriebenen Assays, die die Markerlectine ConA, LCA und PHA-E nutzen.

5

10

15

20

25

In einer bevorzugten Ausführungsform wird im erfindungsgemäßen Sandwich-Immunoassay UEA als Lectin eingesetzt. Als Fängerantikörper an der festen Phase können sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper Verwendung finden.

In einer Ausführungsform wird der Sandwich-Immunoassay dem immobilisierten Anti-Fucdaß durchgeführt, Protein-Antikörper ein mit einem Akzeptor markiertes Lectin ausgewählt aus UEA, LTA und AAA zugesetzt wird und danach mit einem markierten Rezeptor, der an den Der inkubiert wird. Lectins bindet, des Akzeptor Nachweis wird in diesem Fall über den Marker amAls Akzeptor zur Markierung Rezeptor geführt. Lectins können Haptene oder niedermolekulare Liganden Biotin kommt eingesetzt werden, vorzugsweise Entsprechend finden in einer bevorzugten Anwendung. Ausführungsform markiertes Avidin, Streptavidin oder deren Derivate als Rezeptor Verwendung. Werden als Akzeptor Haptene eingesetzt, so finden als Rezeptor Hapten-spezifische Antikörper Anwendung.

5

können erfindungsgemäß Enzyme, Rezeptormarker Als Farbstoffe, Radioisotope, Metallkolloide, Chelatoren oder Spinmarker eingesetzt werden. Vorzugsweise wird Enzym wie beispielsweise Rezeptormarker ein als Meerrettich-Peroxidase (POD), alkalische Phosphatase, β -Galaktosidase, Urease oder Glucoseoxidase eingesetzt und die Menge des Fuc-Protein-Antikörperkomplexes durch eine Substratreaktion dieses Enzyms nachgewiesen. Ausführungsform besonders bevorzugten einer erfindungsgemäß POD zur Markierung verwendet und die Substratreaktion mittels eines chromogenen Substrats, z.B. mit H₂O₂-Tetramethylbenzidin, durchgeführt. Es ist erfindungsgemäß jedoch auch möglich und dem Fachmann die daß die Substratreaktionen für geläufig, unterschiedlicher mittels verschiedensten Enzyme Chemolumineszenz oder Substrate, chromogener Fluoreszenz nachgewiesen werden können.

5

10

15

20

25

Der erfindungsgemäße Immunoassay wird also in einer besonders bevorzugten Ausführungsform als Enzymimmunoassay durchgeführt. Alternativ kann der Rezeptor jedoch auch mit einem Radioisotop (z.B. ¹²⁵J), mit einem Fluoreszenzmarker (z.B. FITC), einem Metallkolloid (z.B. Gold), einem Chelator (z.B. DTTA), mit Polynucleotiden oder mit einem Spinmarker (z.B. PROXYL) markiert sein.

Es ist erfindungsgemäß auch möglich, das mit einem Akzeptor markierte Lectin und den Rezeptor als präformierten Komplex dem Antigen-Antikörperkomplex

6

zuzusetzten, so daß bei der Durchführung der genannten Assayvariante ein Verfahrensschritt entfällt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Immunoassay auch als direkter Assay durchgeführt werden. In diesem Fall trägt das erfindungsgemäße Lectin selbst die genannten Marker. Auch hier ist die Durchführung als Enzymimmunoassay bevorzugt.

In einer dritten Variante wird im erfindungsgemäßen Assay unmarkiertes Lectin eingesetzt und der Nachweis über markierte Anti-Lectin-Antikörper geführt. Es können hierbei sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper gegen UEA, LTA oder AAA oder deren Fragmente eingesetzt werden. Auch hier ist die Durchführung als Enzymimmunoassay bevorzugt.

Als biologische Probe ist im Sinne der Erfindung jede Probe einer Körperflüssigkeit von Mensch oder Tier zu verstehen, die fucosylierte Proteine enthalten kann. Beispielsweise kann das Blut, Plasma, Urin, Serum, Magensaft, Ascites Gewebeflüssigkeit, Lymphe, Speichel sein. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können fucosylierte Proteine wie z.B. α-Fetoprotein, gentechnisch oder erzeugte aus fucosylierte, biologischem Material gewonnene Pharmaproteine oder Adhäsionsproteine (z.B. CD22) bestimmt werden.

25

5

10

15

5

10

15

20

25

Es hat sich gezeigt, daß der erfindungsgemäße Assay insbesondere zur Differentialdiagnose von Lebererkrankungen geeignet ist und sich durch die Bestimmung der Menge an fucosyliertem α -Fetoprotein (AFP) im Serum eine zuverlässige Aussage über ein möglicherweise vorhandenes hepatocelluläres Carcinom (HCC) treffen läßt, da der Fucose-spezifische AFP-Gehalt bei HCC-Patienten signifikant erhöht ist (vgl. Abb. 1).

erfindungsgemäße AFP-Assay enthält in einer Der als Ausführungsform bevorzugten besonders Phase polyklonale der festen Fängerantikörper an Antikörper oder deren Fragmente aus Maus, Kaninchen Antigen-Biotinyliertes dem UEA wird Huhn. mit einem Avidin-, Antikörperkomplex zugesetzt und Streptavidin-POD-Konjugat modifizierten Avidin- oder Fuc-Protein-Antikörperkomplexes Detektion des die durchgeführt.

Die erfindungsgemäße technische Lösung eröffnet also auf Lebertumor-Verdacht bei die Möglichkeit, Erkrankungen den Gesamt-AFP-Gehalt z.B. mittels eines üblichen Enzym-Immunoassays zu bestimmen und parallel dazu den Gehalt an fucosyliertem AFP (z.B. auf einer Aufbau dieser Mikrotestplatte) festzustellen. Der kann beispeilsweise wie nachfolgend beiden Assays dargestellt aussehen:

PCT/EP99/00639

Assay Gesamt-AFP:

- Immobilisierter anti-AFP-Antikörper bzw. Antikörperfragmet der Spezies 1 (z.B. Maus, Kaninchen,
 Huhn)
- 2. AFP-Standard-Verdünnung bzw. verdünntes Patientenserum
- 3. Enzym-markierter anti-AFP-Antikörper bzw. Antikörperfragment der Spezies 2 (z.B. Maus, Kaninchen,
 Huhn). Enzym z.B. Meerrettichperoxidase (POD) oder
 Alkalische Phosphatase (AP)
- 4. Substratreaktion

Assay fucosyliertes-AFP:

15

5

10

- Immobilisierter anti-AFP-Antikörper bzw. -Antikörperfragmet der Spezies 1 (z.B. Maus, Kaninchen, Huhn)
- 2. Verdünntes Patientenserum
- 3. Markiertes Lectin ausgewählt aus UEA, LTA oder AAA (z.B. biotinyliertes UEA)
 - 4. Markierungsspezifisches Enzymkonjugat (z.B. Avidin/Streptavidin-POD-Konjugat bzw. -Komplex)
 - 5. Substratreaktion

25

Neben dem Bestimmungsverfahren hat die Erfindung auch die zugehörigen Reagentiensätze, wie sie in den Ansprüchen ausgewiesen sind, zum Gegenstand.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

5

10

15

20

25

30

a) Herstellung von Anti-human-AFP-IgG-F(ab)2-Fragmenten

aa) Antiserum-Gewinnung

Kaninchen werden mit hochreinem humanen AFP aus Nabelschnurblut immunisiert. Aus dem Blut der immunisierten Tiere wird nach Koagulation das Antiserum durch Zentrifugation abgetrennt.

ab) Isolierung der Gesamt-IgG-Fraktion

Das Serum wird auf eine AFP-Sepharose gegeben. Ungebundene Serumprotein werden mit TRIS-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (TBS) ausgewaschen. Anließend wird das Anti-AFP-IgG mit einem 0,2M Glycin-HCl Puffer pH 2,5 eluiert, mit 1M Tris-HCl pH 7,5 neutralisieret, mit Centricon-30-kD-Kartuschen konzentriert und gegen 50 mM Acetat-Puffer pH 4,0; 0,5M NaCl, 0,02% NaN3 umgepuffert.

ac) Antikörperfragmentierung mittels Pepsin

Es wird ein Enzym-IgG-Verhältnis von E:P=1:50 eingestellt und 4h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 1M Tris-HCl pH 7,5 beendet. Anschließend werden die Anti-AFP-F(ab)2-Fragmente durch Immunaffinitätschromatographie an einer AFP-Säule wie unter ab) beschrieben isoliert, konzentriert, gegen TBS dialysiert und bei 4° C gelagert.

5

10

15

20

25

30

b) Immunoassay zur Gesamt-AFP-Bestimmung

Die Vertiefungen einer Mikrotestplatte sind mit antihuman-AFP-IgG (F(ab)2-Fragment, Kaninchen) durch Adsorption aus einer Lösung von 10µg F(ab)2/ml in Bicarbonatpuffer pH 8,5-9,5 belegt. Eine unspezifische Proteinadsorption ist durch Blockierung der Plastoberfläche mit einer Inertprotein-Lösung (z.B. Rinderserumalbumin in Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS)) reduziert. In die so beschichteten Vertiefungen wird entweder eine Standard-Verdünnungsreihe von humanem AFP (Konzentrationsbereich 2 bis 300 ng/ml) bzw. eine zentrifugierte, 1:5 bis 1:10 verdünnte Probe Patientenserum gegeben. Ungebundenes Material wird ausgewaschen, dann wird mit einer geeigneten Verdünnung anti-human-AFP-IgG-POD-Konjugat inkubiert. Ungebundenes Material wird ausgewaschen, dann wird die Substratreaktion mit H_2O_2 -Tetramethylbenzidin gestartet und einer definierten Zeit mit Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wird bei 450 nm gemessen. Der Gehalt an AFP im Patientenserum wird anhand der Standard-Verdünnungsreihe ermittelt.

Beispiel 2

Erfindungsgemäßer Immunoassay zur Fuc-AFP-Bestimmung

Die Vertiefungen einer Mikrotestplatte sind mit antihuman-AFP-IgG (F(ab)2-Fragment, Kaninchen), wie in Beispeil la hergestellt, durch Adsorption aus einer Lö-

sung von 10µg F(ab)2/ml in Bicarbonatpuffer pH 8,5-9,5 belegt. Eine unspezifische Proteinadsorption ist durch Blockierung dr Plastoberfläche mit einer Inertprotein-Lösung (z.B. Rinderserumalbumin in Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS)) reduziert. In die so beschichteten Vertiefungen wird eine zentrifugierte, 1:5 bis 1:10 verdünnte Probe Patientenserum gegeben. Ungebundenes Material wird ausgewaschen, dann wird mit einer geeigneten Verdünnung biotinyliertes Ulex-europaeus-Lectin (bio-UEA) inkubiert. Ungebundenes Material wird ausgewaschen, dann wird mit einer geeigneten Verdünnung Acylavidin-biotinylierte POD-Komplex (AbP) inkubiert. Ungebundenes Material wird ausgewaschen, dann wird die Substratreaktion mit H_2O_2 -Tetramethylbenzidin gestartet und nach einer definierten Zeit mit Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wird bei 450 nm gemessen.

Beispiel 3

20

25

5. .

10

15

Es werden die Ergebnisse der Beispiele 1 und 2 für verschiedene Probanden dargestellt (Abb. 2). Es wird deutlich, daß der Gesamt-AFP-Gehalt nicht mit dem Gehalt an UEA-reaktivem AFP korreliert, so daß erst mit dem erfindungsgemäßen Test wirklich festgestellt werden kann, ob bei erhöhten AFP-Werten tatsächlich auch eine erhöhte Menge an fucolysiertem AFP vorliegt.

PCT/EP99/00639

12

Es zeigen:

WO 99/39209

Abb. 1: Gehalt an fucosyliertem AFP in PatientenSerumproben

control - gesunde Probanden, SLE - systemischer Lupus erythromateus, AIH - autoimmune
Hepatitis, PBC - polynucleare billäre Cirrhose, HCC - hepatocelluläres Carcinom

10

Abb. 2: Vergleich des Gehalts an Gesamt- und fucosyliertem AFP in verschiedenen HCC-Patienten-Seren

Patentansprüche

 Immunoassay zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein (Fuc-Protein) in einer biologischen Probe,

dadurch gekennzeichnet, daß

5

10

15

20

- a) ein immobilisierter Anti-Fuc-Protein-Antikörper oder ein immobilisiertes Anti-Fuc-Protein-Antikörperfragment mit der biologischen Probe unter Ausbildung eines Fuc-Protein-Antiköperkomplexes inkubiert wird und
- ein Lectin ausgewählt aus der Gruppe Ulexeuropaeus-Agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolobus-Agglutinin (LTA) und Anguilla-anguilla-Agglutinin (AAA) zugesetzt wird, das geeignete Markierungen Fuc-Proteindie Menge des aufweist, um die Menge daraus Antiköperkomplexes und fucosyliertem Protein in an sich bekannter Weise zu bestimmen oder
- b) ein unmarkiertes Lectin ausgewählt aus Gruppe Ulex-europaeus-Agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolo-bus-Agglutinin (LTA) und Anguilla-anguilla-Agglutinin (AAA) zugesetzt wird und der Nachweis des Fuc-Protein-Antikörperkomplexes mittels markierter Anti-Lectin-Antikörper oder deren Fragmente gegen die genannten Lectine in an sich bekannter Weise erfolgt.

14

 Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

b) ein mit einem Akzeptor markiertes Lectin gemäß Anspruch 1 zugesetzt wird, mit einem markierten Rezeptor, der an den Akzeptor des Lectins bindet, inkubiert wird und in üblicher Weise mittels des Markers am Rezeptor die Menge des Fuc-Protein-Antikörperkomplexes, und daraus die Menge an fucosyliertem Protein bestimmt wird.

 Immunoassay nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

die Menge an fucosyliertem Protein direkt bestimmt wird durch b) Zusatz eines derart markierten Lectins, daß die Bestimmung der Menge des Fuc-Protein-Antikörperkomplexes mittels des Markers am Lectin erfolgen kann.

20

25

15

5

10

4. Immunoassay nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß

die Menge an fucosyliertem $\alpha\text{-Fetoprotein}$ (AFP) bestimmt wird.

15

- 5. Immunoassay nach Anspruch 2, dadurch gegekennzeichnet, daß ein Lectin eingesetzt wird, das mit einem Hapten oder einem niedermolekularen Liganden als Akzeptor markiert ist.
- 6. Immunoassay nach den Ansprüchen 2 und 5,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 das Lectin mit Biotin als Akzeptor markiert ist und
 als Rezeptor Avidin, Streptavidin oder deren
 Derivate eingesetzt werden.

5

10

20

- 7. Immunoassay nach den Ansprüchen 2 und 5,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 das Lectin mit einem Hapten markiert ist und als
 Rezeptor ein Hapten-spezifischer Antikörper eingesetzt wird.
 - 8. Immunoassay nach den Ansprüchen 2 und 5 bis 7,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 als Rezeptormarker ein Enzym, ein Farbstoff, ein
 Radioisotop, ein Metallkolloid, ein Chelator, ein
 Nucleotid oder ein Spinmarker eingesetzt wird.

5

10

15

- 9. Immunoassay nach Anspruch 3,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 als Lectinmarker ein Enzym, ein Farbstoff, ein
 Radioisotop, ein Metallkolloid, ein Chelator, ein
 Nucleotid oder ein Spinmarker eingesetzt wird.
- 10. Immunoassay nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 als Marker der Anti-Lectin-Antikörper ein Enzym,
 ein Farbstoff, ein Radioisotop, ein Metallkolloid,
 ein Chelator, ein Nucleotid oder ein Spinmarker
 eingesetzt wird.
- 11. Testkit zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem Protein (Fuc-Protein) in einer biologischen Probe enthaltend markiertes oder unmarkiertes Lectin ausgewählt aus der Gruppe Ulex-europaeus-Agglutinin (UEA), Lotus-tetragonolobus-Agglutinin (LTA) und Anguilla-anguilla-Agglutinin (AAA)
- 12. Testkit nach Anspruch 11,
 25 dadurch gekennzeichnet, daß
 er einen anti-Fuc-Protein-Antikörper oder ein AntiFuc-Protein-Antikörperfragment beinhaltet.

17

- 13. Testkit nach Anspruch 11 oder 12,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 er ein mit einem Akzeptor markiertes Lectin und
 einen markierten Rezeptor, der an den Akzeptor des
 Lectins bindet, beinhaltet, die gegebenenfalls auch
 bereits als präformierter Komplex vorliegen können.
- 14. Testkit nach Anspruch 13,

 dadurch gekennzeichnet, daß

 er als mit einem Akzeptor markiertes Lectin
 biotinyliertes UEA beinhaltet.

5

- 15. Testkit nach Anspruch 11 oder 12,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 er unmarkiertes Lectin und markierte Anti-LectinAntikörper gegen dieses Lectin beinhaltet.
 - 16. Testkit nach einem der Ansprüche 11 bis 15 zur Bestimmung der Menge an fucosyliertem α -Fetoprotein (AFP).

Abb. 1: Gehaltan fucosyliertem AFP in Patienten-Serumproben

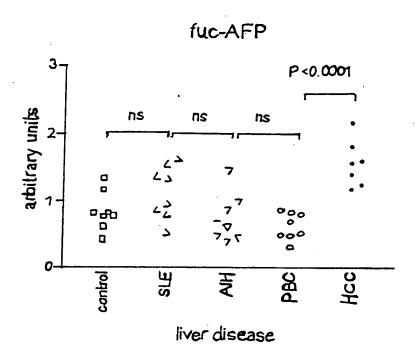
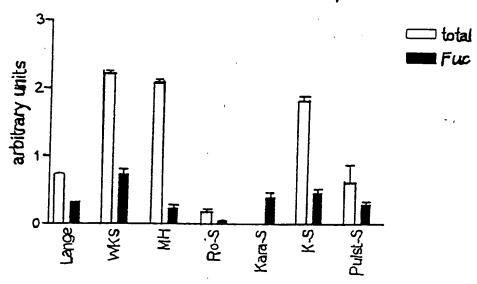


Abb. 2: Vergleich des Gehalts an Gesamt- und fucosyliertem AFP in verschiedenen HCC-Patienten-Seren

total AFP and Fuc-AFP, resp.



HCC patient

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interns (al Application No PCT/FP 99/00639

		PCT/EP 99/00639			
A. CLASSI IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574				
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both national das	sification and IPC			
	SEARCHED				
Minimum do IPC 6	cumentation searched (classification system followed by classification sy	ication symbols)			
	tion searched other than minimum documentation to the extent the				
Electronic d	ata base consulted during the international search (name of data	a base and, where practical	, search terms used)		
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	e relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 90 05304 A (OERNTOFT TORBEN 17 May 1990 see page 1 - page 13	FALCK)	1-16		
X	THOMPSON, STEPHEN ET AL: "A mulectin —binding assay using Lotetragonolobus for measuring diglycosylated forms of haptoglol CLIN. CHIM. ACTA (1989), 180(3 CODEN: CCATAR;ISSN: 0009-8981, see the whole document	tus ifferent oin"), 277-84	1,11		
		-/			
X Fun	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family	members are listed in annex.		
' Special come consider the consider of the consideration of the co	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or means lent published prior to the international filing date but than the priority date claimed	or priority date an cited to understar invention "X" document of partic cannot be considint invention "Y" document of partic cannot be considint document is comment, such comin the art. "8" document membe	blished after the international filing date and not in conflict with the application but and the principle or theory underlying the sular relevance; the claimed invention ered novel or cannot be considered to live step when the document is taken alone sular relevance; the claimed invention ered to involve an inventive step when the bined with one or more other such docubination being obvious to a person skilled		
	actual completion of the international search	Date of mailing of 06/07/2	the international search report		
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (-31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Moreno, C			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No PCT/EP 99/00639

Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages BALDUS, STEPHAN E. ET AL: "Characterization of the binding specificity of Anguilla anguilla agglutinin (AAA) in comparison to Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I)" GLYCOCONJUGATE J. (1996), 13(4), 585-590 CODEN: GLJOEW; ISSN: 0282-0080, XP002105687 see abstract DATABASE WPI Section Ch, Week 8705 Derwent Publications Ltd., London; GB; Class A96, AN 87-034232 XP002105688 & JP 61 292062 A (HIRAI H) , 22 December 1986 see abstract EP 0 157 427 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 9 October 1985 see examples		1,11 1,4,11, 16
BALDUS, STEPHAN E. ET AL: "Characterization of the binding specificity of Anguilla anguilla agglutinin (AAA) in comparison to Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I)" GLYCOCONJUGATE J. (1996), 13(4), 585-590 CODEN: GLJOEW; ISSN: 0282-0080, XP002105687 see abstract DATABASE WPI Section Ch, Week 8705 Derwent Publications Ltd., London; GB; Class A96, AN 87-034232 XP002105688 & JP 61 292062 A (HIRAI H), 22 December 1986 see abstract EP 0 157 427 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 9 October 1985 see examples		1,11
"Characterization of the binding specificity of Anguilla anguilla agglutinin (AAA) in comparison to Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I)" GLYCOCONJUGATE J. (1996), 13(4), 585-590 CODEN: GLJOEW; ISSN: 0282-0080, XP002105687 see abstract DATABASE WPI Section Ch, Week 8705 Derwent Publications Ltd., London; GB; Class A96, AN 87-034232 XP002105688 & JP 61 292062 A (HIRAI H), 22 December 1986 see abstract EP 0 157 427 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 9 October 1985 see examples		1,4,11, 16
Section Ch, Week 8705 Derwent Publications Ltd., London; GB; Class A96, AN 87-034232 XP002105688 & JP 61 292062 A (HIRAI H) , 22 December 1986 see abstract EP 0 157 427 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 9 October 1985 see examples		
9 October 1985 see examples		1,11
		
WO 97 31107 A (COLES JOHN G ;YOUNG DAVID S F (CA); BROCKHAUSEN INKA (CA)) 28 August 1997 see abstract		1,11
	·	
	28 August 1997 see abstract	28 August 1997 see abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. (al Application No PCT/EP 99/00639

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family Publication member(s) date		Publication date
WO 9005304	Α	17-05-1990	AU	4632689 A	28-05-1990
NO 25005504	••		CA	2002766 A	10-05-1990
EP 0157427		09-10-1985	JP	60214737 A	.28-10-1985
Li 013/42/	•••		ΑU	593210 B	08-02-1990
			AU	4081085 A	10-10-1985
			CA	1243607 A	25-10-1988
			CA	1240214 A	09-08-1988
			DK	147885 A	07-10-1985
	•		FI	851373 A	07-10-1985
			PH	21133 A	27-07-1987
			PT	80233 A.B	01-05-1985
	•		US	4849510 A	18-07-1989
W0 9731107	Α	28-08-1997	AU	1586997 A	10-09-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. .iales Aktenzeichen PCT/EP 99/00639

A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N33/574	•
Nach der Int	ernationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE	
Recherchier IPK 6	ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N	
Recherchie	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete	e tallen
	r internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete	occident,
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 90 05304 A (OERNTOFT TORBEN FALCK) 17. Mai 1990 siehe Seite 1 - Seite 13	1-16
X	THOMPSON, STEPHEN ET AL: "A multiwell lectin -binding assay using Lotus tetragonolobus for measuring different glycosylated forms of haptoglobin" CLIN. CHIM. ACTA (1989), 180(3), 277-84 CODEN: CCATAR; ISSN: 0009-8981, XP002105686 siehe das ganze Dokument	1,11

·	
Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie
 Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "U" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Priontätsdatum veröffentlicht worden ist 	T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategone in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
11. Juni 1999	06/07/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt. P.B. 5818 Patenttaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna ales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00639

C.(Fortsetz	ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
(ategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, sowert erforderlich unter Angabe der in Betracht kommen	nden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A .	BALDUS, STEPHAN E. ET AL: "Characterization of the binding specificity of Anguilla anguilla agglutinin (AAA) in comparison to Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I)" GLYCOCONJUGATE J. (1996), 13(4), 585-590 CODEN: GLJOEW;ISSN: 0282-0080, XP002105687 siehe Zusammenfassung		1,11
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8705 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 87-034232 XP002105688 & JP 61 292062 A (HIRAI H) , 22. Dezember 1986 siehe Zusammenfassung		1,4,11,
Α	EP 0 157 427 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 9. Oktober 1985 siehe Beispiele		1,11
Α	WO 97 31107 A (COLES JOHN G ;YOUNG DAVID S F (CA); BROCKHAUSEN INKA (CA)) 28. August 1997 siehe Zusammenfassung		1,11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentlamilie gehören

Interna. ales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00639

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung			Datum der Veröffentlichung	
WO 9005304	A	17-05-1990	AU CA	4632689 A		28-05-1990 10-05-1990
					·	
EP 0157427	Α	09-10-1985	JP AU	60214737 <i>F</i> 593210 E	-	28-10-1985 08-02-1990
			AU CA	4081085 A	•	10-10-1985 25-10-1988
			CA	1240214		09-08-1988
			DK FI	147885 / 851373 /	-	07-10-1985 07-10-1985
		,	PH	21133		27-07-1987
			PT	80233	•	01-05-1985
			US	4849510	A 	18-07-1989
WO 9731107	Α	28-08-1997	AU	1586997	Α	10-09-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)